绿原酸提高舞毒蛾核型多角体病毒(LdNPV)的致病力

刘海晶[1]，段立清[1,2,*]，李海平[2]，冯淑军[2]，张波波[1]

(1. 内蒙古农业大学林学院，呼和浩特 010019；2. 内蒙古农业大学农学院，呼和浩特 010019)

摘要：【目的】明确绿原酸(chlorogenic acid, CA)对舞毒蛾核型多角体病毒 *Lymantria dispar* necleopolyhydrovirus (LdNPV)致病力的影响,为舞毒蛾的防治提供参考依据。【方法】采用食料给毒法进行生物测定,测定舞毒蛾2龄幼虫对单独 LdNPV 及添加绿原酸的 LdNPV(CA + LdNPV)的剂量及致死时间响应。【结果】CA + LdNPV 与单独 LdNPV 对舞毒蛾2龄幼虫的剂量及时间响应间有显著差异,二者对舞毒蛾2龄幼虫的致死中浓度(LC_{50})分别为 161.8 OBs/μL(95%的置信区间为 105.6 ~235.3 OBs/μL)和 264.4 OBs/μL(95%的置信区间为 178.6 ~384.0 OBs/μL),前者对舞毒蛾的致病力较后者强。CA + LdNPV 对舞毒蛾2龄幼虫的致死中时间(LT_{50})较 LdNPV 的短,当 LdNPV 浓度为 590 OBs/μL,CA + LdNPV 及 LdNPV 对舞毒蛾2龄幼虫的 LT_{50} 分别为 9.9 d 和 12.3 d；当 LdNPV 浓度为 5 900 OBs/μL 时,则 LT_{50} 分别为 6.9 d 和 8.0 d。绿原酸降低了 LdNPV 对舞毒蛾幼虫的致死中浓度,缩短了致死中时间。【结论】绿原酸可提高 LdNPV 对舞毒蛾2龄幼虫的致病力,其机理有待进一步研究。

关键词：舞毒蛾；核型多角体病毒；绿原酸；致病力；致死中浓度；致死中时间

中图分类号：Q965.8 **文献标识码：**A **文章编号：**0454-6296(2016)05-568-05

Chlorogenic acid enhances the virulence of *Lymantria dispar* necleopolyhydrovirus (LdNPV)

LIU Hai-Jing[1], DUAN Li-Qing[1,2,*], LI Hai-Ping[2], FENG Shu-Jun[2], ZHANG Bo-Bo[1] (1. Forestry College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, 010019, China; 2. Agricultural College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China)

Abstract:【Aim】To identify the effects of chlorogenic acid (CA) on the virulence of *Lymantria dispar* necleopolyhydrovirus (LdNPV) so as to provide information for the prevention and control of the gypsy moth, *L. dispar*.【Methods】CA + LdNPV and LdNPV were bioassayed using diet plus method, to determine the dose and time response of the 2nd instar larvae of *L. dispar*.【Results】CA + LdNPV and LdNPV differed significantly in dose and time response when they were tested against the *L. dispar* larvae. The median lethal concentration (LC_{50}) value of CA + LdNPV to the 2nd instar larvae was 161.8 OBs/μL (the 95% confidence limit was 105.6 –235.3 OBs/μL), and that of LdNPV was 264.4 OBs/μL (the 95% confidence limit was 178.6 –384.0 OBs/μL). CA + LdNPV was more virulent than LdNPV against *L. dispar* larvae. The median lethal time (LT_{50}) value of CA + LdNPV was shorter than that of LdNPV. The LT_{50} values of CA + LdNPV and LdNPV were 9.9 and 12.3 days, respectively, at the concentration of 590 OBs/μL of LdNPV, and 6.9 and 8.0 days, respectively, at the concentration of 5 900 OBs/μL. The CA lowered the LC_{50} value and shortened the LT_{50} value of LdNPV against the 2nd

基金项目：国家自然科学基金项目(31160161)；林业公益性行业科研专项项目(201504302)

作者简介：刘海晶，1989年1月生，女，内蒙古赤峰人，硕士研究生，研究方向为森林害虫生物防治，E-mail：15024934629@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：duanlq2013@163.com

收稿日期 Received：2016-03-02；接受日期 Accepted：2016-04-19

instar larvae of *L. dispar*.【Conclusion】Chlorogenic acid enhances the virulence of LdNPV against the 2nd instar larvae of *L. dispar*, and its action mechanism needs further study.

Key words: *Lymantria dispar*; LdNPV; chlorogenic acid; virulence; median lethal concentration; median lethal time

绿原酸广泛存在于高等双子叶植物和蕨类植物中,是由咖啡酸(caffeic acid)与奎尼酸(quinic acid)组成的缩酚酸,异名咖啡单宁酸,属于正双羟基酚类(邓良等, 2005)。青杨受茉莉酸诱导(越慧芳, 2013)及合作杨舞毒蛾危害(胡增辉等, 2009)时其叶片绿原酸含量显著增加,降低了舞毒蛾生长发育速度(越慧芳等, 2013)。取食含 0.3% 的绿原酸人工饲料增加了舞毒蛾幼虫的死亡率,甚至不能完成生活周期(王晓丽等, 2014)。酚酸类物质会改变植食性昆虫对病毒(Felton *et al*., 1987)、细菌(Campo *et al*., 2013)、真菌(Sandre *et al*., 2011)的敏感性。取食含有绿原酸的人工饲料的烟草天蛾 *Manduca sexta* 幼虫对乳酸球菌 *Enterococcus faecali* 病原菌的敏感性显著降低(Campo *et al*., 2013),但将苏云金杆菌库斯塔克变种 *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (BTK)菌悬液与绿原酸及多酚氧化酶混合,增加了 BTK 对美洲棉铃虫 *Heliothis zea* 的致病力(Ludlum *et al*., 1991)。绿原酸是否会影响舞毒蛾核型多角体病毒致病力尚未有任何报道,我们在室内通过在舞毒蛾人工饲料中添加一定浓度的绿原酸,研究该问题,探讨植物次生物质对昆虫病原微生物致病力的影响。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

舞毒蛾越冬卵采自辽宁省阜新市林业局。轻搓卵块取覆盖毛状物,卵粒经 2% 的 84 消毒液(有效氯含量为 50 ± 7.5 g/L)消毒 1 min,蒸馏水冲洗 3 次,阴干,放入培养皿中,于温度为 25 ± 1℃,光周期 16L∶8D 的气候培养箱孵化;初孵幼虫转入装有人工饲料的养虫杯中,在相同条件饲养至 2 龄,取同一天达到 2 龄的舞毒蛾幼虫备用。

1.2 人工饲料

舞毒蛾人工饲料参考加拿大太平洋森林研究中心(Pacific Forestry Centre, PFC)提供的配方进行配制,在正常饲料添加 200 μg/g 绿原酸(chlorogenic acid, CA)(贵州迪大生物科技有限责任公司)配制成 CA 饲料,其含量参考 Yamamoto(1969),制备好的饲料 4℃冷藏备用,每份饲料的使用期限为一星期以内。

1.3 舞毒蛾核型多角体病毒

由内蒙古农业大学农学院植物保护教研室保存的感染 LdNPV 的舞毒蛾死虫经蔗糖梯度提纯得到,用蒸馏水稀释到所需浓度。通过预实验设 4 个病毒浓度(5.9, 59, 590 和 5 900 OBs/μL)和 1 个对照(蒸馏水),每个浓度 3 个重复,每一重复 60 头 2 龄幼虫,共计 1 800 头幼虫。

1.4 生物测定

采用人工饲料段(Duan and Otvos, 2001)的方法,将人工饲料段(约 8 mg)置于 24 孔组织培养皿中,用微量移液器滴加病毒液 1 μL(对照滴加蒸馏水),每孔再接入 1 头饥饿 24 h 的 2 龄幼虫,封口加盖、遮光,放入气候培养箱(25 ± 1℃,光周期 16L∶8D),取食 24 h,将完全食尽饲料段的幼虫转入小养虫杯内饲养,每天观察、记录幼虫死亡、蜕皮情况。实验共设置 4 个处理(正常饲料 + 病毒、正常饲料 + 蒸馏水、CA 饲料 + 病毒和 CA 饲料 + 蒸馏水)。

1.5 数据统计与分析

数据处理采用 Microsoft Excel 对取食不同病毒浓度处理的舞毒蛾幼虫死亡情况进行统计,用 POLO-PC 软件对不同病毒浓度处理的舞毒蛾幼虫毒力进行分析。

2 结果

2.1 舞毒蛾幼虫对 LdNPV 浓度变化的响应

正常人工饲料和添加绿原酸人工饲料饲养舞毒蛾感病幼虫死亡率如图 1,可见舞毒蛾幼虫死亡率随着病毒浓度的增加而增加,而且同一病毒浓度下,取食添加绿原酸的人工饲料的幼虫死亡率(图 1: B)较正常人工饲料(图 1: A)的高。另外,病毒浓度的增加也影响舞毒蛾幼虫发病速度,浓度越高,发病越快。浓度为 5 900 OBs/μL 时,舞毒蛾幼虫在给毒的第 6 天就开始大量死亡,第 11 天死亡率高达 92.8%;浓度为 5.9 OBs/μL 时,第 10 – 12 天时才开始死亡,到第 15 天时死亡率达 32.2%。没有感染病毒的幼虫取食添加绿原酸的人工饲料第 5 天也开始出现死亡个体,第 14 天时死亡率达 14.4%,而取

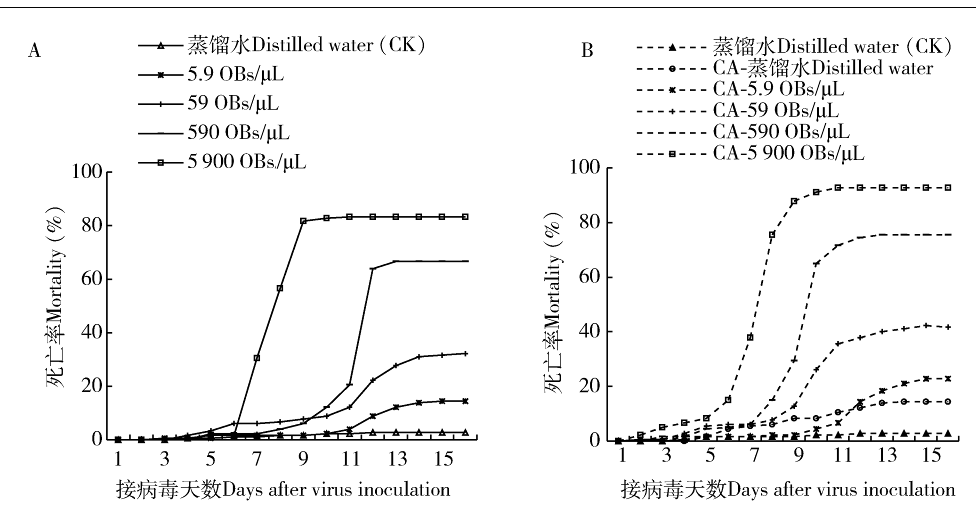


图 1 取食正常人工饲料(A)和添加绿原酸人工饲料(B)的舞毒蛾 2 龄幼虫对 LdNPV 浓度变化的响应

Fig. 1 Response of the 2nd instar larvae of *Lymantria dispar* fed on the normal artificial diet (A) and the artificial diet containing chlorogenic acid (B) to different concentrations of LdNPV

绿原酸添加浓度为 200 μg/g;表 1 和 2 同。200 μg/g chlorogenic acid was added to the diet. The same for Tables 1 and 2.

食正常人工饲料的幼虫死亡率只有 3%。

2.2 绿原酸对 LdNPV 对舞毒蛾 2 龄幼虫致病力的影响

取食添加绿原酸人工饲料和正常人工饲料的舞毒蛾幼虫的 LdNPV 致死中浓度(LC_{50})见表 1,添加绿原酸的 LdNPV(CA + LdNPV)对舞毒蛾 2 龄幼虫的 LC_{50}为 161.8 OBs/μL,95% 置信区间为 105.6 ~ 235.3 OBs/μL,单独 LdNPV 对舞毒蛾 2 龄幼虫的 LC_{50}为 264.4 OBs/μL,95% 置信区间为 178.6 ~ 384.0 OBs/μL,二者的 LC_{50}及 LC_{90}的 95% 置信区间重叠度均小于 50%,说明二者之间差异显著,添加绿原酸使 LdNPV 对舞毒蛾 2 龄幼虫的致病力提高了 0.6 倍。CA + LdNPV 处理的斜率较大,说明舞毒蛾幼虫个体间对 CA + LdNPV 敏感性差异减小,对 LdNPV 的敏感性差异较大。

由表 2 可知,舞毒蛾幼虫取食添加绿原酸人工饲料,LdNPV 浓度为 590 OBs/μL 时,致死中时间(LT_{50})为 9.9 (9.1 ~ 10.8) d;浓度为 5 900 OBs/μL 时,LT_{50}为 6.9 (6.0 ~ 8.0) d;舞毒蛾幼虫取食正常饲料,LdNPV 浓度为 590 OBs/μL 时,LT_{50}为 12.3 (11.5 ~ 13.8) d,浓度为 5 900 OBs/μL 时,LT_{50}为 8.0 (7.8 ~ 8.2) d。在同样病毒浓度下,添加绿原酸人工饲料使 LdNPV 对舞毒蛾幼虫的 LT_{50}缩短,病毒浓度越低时 LT_{50}缩短越明显,浓度为 590 OBs/μL 时,缩短 2.4 d;浓度为 5 900 OBs/μL 时,缩短 1.1 d。综合以上结果可见人工饲料中添加绿原酸对 LdNPV 毒力具有增强作用。

表 1 绿原酸对 LdNPV 对舞毒蛾 2 龄幼虫致死中浓度的影响

Table 1 Effects of chlorogenic acid on the LC_{50} value of LdNPV to the 2nd instar larvae of *Lymantria dispar*

处理 Treatment	斜率 ± *SE* Slope ± *SE*	LC_{50}及 95% 置信限(OBs/μL) LC_{50} and 95% confidence limit	LC_{90}及 95% 置信限(OBs/μL) LC_{90} and 95% confidence limits	卡方 χ^2	自由度 *df*	毒力比 Virulence ratio
CA + LdNPV	0.91 ± 0.08	161.8 (105.6 – 235.3)	4 139.4 (2 552.0 – 7 719.2)	6.6	10	1.6
LdNPV	0.76 ± 0.06	264.4 (178.6 – 384.0)	13 033.9 (7 222.9 – 28 043.1)	4.6	10	

CA + LdNPV: 病毒处理的绿原酸饲料 Artificial diet containing chlorogenic acid and mixed with LdNPV; LdNPV: 单独病毒处理的正常饲料 Normal artificial diets mixed with LdNPV. 下同 The same below.

表 2 绿原酸对 LdNPV 对舞毒蛾 2 龄幼虫致死中时间的影响

Table 2 Effects of chlorogenic acid on the LT_{50} value of LdNPV to the 2nd instar larvae of *Lymantria dispar*

LdNPV 浓度(OBs/μL) LdNPV concentration	处理 Treatment	死亡率(%) Mortality	斜率 ± *SE* Slope ± *SE*	LT_{50}及 95% 置信限(d) LT_{50} and 95% confidence limits	LT_{90}及 95% 置信限(d) LT_{90} and 95% confidence limits	χ^2	*df*
590	CA + LdNPV	75.56	6.8 ± 0.3	9.9 (9.1 – 10.8)	15.1 (13.1 – 19.0)	381	36
	LdNPV	66.67	8.5 ± 0.5	12.3 (11.5 – 13.8)	17.4 (15.1 – 22.8)	295	37
5 900	CA + LdNPV	92.78	6.7 ± 0.3	6.9 (6.0 – 8.0)	10.8 (9.1 – 15.2)	743	31
	LdNPV	83.33	10.1 ± 0.5	8.0 (7.8 – 8.2)	10.7 (10.3 – 11.3)	66	31

3 讨论

在人工饲料中添加了酚性物质绿原酸提高了 LdNPV 对舞毒蛾 2 龄幼虫的致病力，表现在致死中浓度的降低和致死中时间的缩短，说明绿原酸对舞毒蛾核型多角体病毒有明显的增效作用。

寄主植物酚性物质含量影响舞毒蛾对核型多角体病毒的敏感性，取食栎树 *Quercus* spp. 类叶片比取食杨树 *Populus* spp. 类死亡率低，栎树叶片的酚性物质含量高于杨树(Keating *et al.*, 1988)，用栎类叶片提取液与 LdNPV 混合，导致 LdNPV 的多角体聚集，将这些多角体聚集物与人工饲料一起饲喂舞毒蛾 4 龄幼虫，其致病力却并未受到影响(Keating *et al.*, 1990)，而我们的实验结果证明添加人工饲料绿原酸使 LdNPV 对舞毒蛾 2 龄幼虫的致病力增加。Keating 等(1990)认为酚性物质对昆虫病毒的影响比较复杂，并不在于多角体的聚集，可能主要取决于昆虫中肠环境，而中肠环境与昆虫的食料及昆虫龄期有关(Schultz and Lechowicz, 1986)，舞毒蛾 4 龄幼虫中肠环境与 2 龄幼虫的有无差异还需进一步研究。

美洲棉铃虫 *H. zea* 核型多角体病毒(HzNPV)粒子与绿原酸接触时，毒性减小(Felton *et al.*, 1989)，与我们对 LdNPV 测定的结果相反。毒性降低的原因推测是绿原酸与 HzNPV 结合会立即被氧化成邻醌类物质，迅速与 HzNPV 粒子共价结合，在肠道碱性条件下减小 HzNPV 的可消化性和水解性。Ali 等(1999)测定绿原酸高表达转基因番茄系列及人工饲料添加绿原酸对烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 和美洲棉铃虫 *H. zea* 对核型多角体病毒(HzSNPV)的敏感性，结果表明供试幼虫病毒死亡率与转基因植株绿原酸含量成正比，但与人工饲料中添加绿原酸量成反比，说明酚性物质对昆虫核型多角体病毒毒力的影响机制比较复杂，需深入研究。

绿原酸也影响昆虫对病原细菌的敏感性。在人工饲料中添加绿原酸后，烟草天蛾 *Manduca sexta* 对乳酸球菌 *Enterococcus faecalis* 的敏感性降低，但对致病性较强的绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的敏感性提高了(Campo *et al.*, 2013)。将 *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (BTk)混合后饲喂美洲棉铃虫 *H. zea* 幼虫，提高了幼虫死亡率(Ludlum *et al.*, 1991)。酚性物质对昆虫的影响作用取决于酚氧化酶的氧化作用(Felton *et al.*, 1989)，或昆虫中肠的自身氧化作用(Summers and Felton, 1994)。植物组织中大量的抗氧化物质(维生素 E、类胡萝卜素、谷胱甘肽、抗坏血酸盐等)会影响酚酸物质(Ahmad, 1992)，而人工饲料中添加酚性物质与植物自身酚性物质对昆虫及其病原物的影响有区别，绿原酸等酚性物质对昆虫病毒等病原微生物的影响及机理尚无定论，还需进一步研究。

参考文献(References)

Ahmad S, 1992. Biochemical defence of prooxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochem. System. Ecol.*, 20: 269 – 296.

Ali MI, Bi JL, Young SY, Felton GW, 1999. Do foliar phenolics provide protection to *Heliothis virescens* from a baculovirus? *J. Chem. Ecol.*, 25(9): 2193 – 2204.

Campo MLD, Halitschke R, Short SM, Lazzaro BP, Kessler A, 2013. Dietary plant phenolic improves survival of bacterial infection in *Manduca sexta* caterpillars. *Entomol. Experim. Appl.*, 146: 321 – 331.

Deng L, Yuan H, Yu ZY, 2005. Research progress of chlorogenic acid. *Chemistry & Bioengineering*, 22: 4 – 6. [邓良, 袁华, 喻宗沅, 2005. 绿原酸的研究进展. 化学与生物工程, 22: 4 – 6]

Duan L, Otvos IS, 2001. Influence of larval age and virus concentration on mortality and sublethal effects of a nucleopolyhedrovirus on the western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Environm. Entomol.*, 30: 136 – 146.

Felton GW, Donato K, Vecchio RJD, Duffey SS, 1989. Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *J. Chem. Ecol.*, 15(12): 2667 – 2694.

Felton GW, Duffey SS, Vail PV, Kaya HK, Manning J, 1987. interaction of nuclear polyhedrosis virus with catechols: potential incompatibility for host-plant resistance against noctuid larvae. *J. Chem. Ecol.*, 13(4): 947 – 957.

Hu ZH, Yang D, Shen YB, 2009. Difference of phenolic contents in leaves of *Populus simonii* × *P. pyramidalis* ‘Opera 8277’ cuttings induced by various damages. *Acta Bot. Borea-Occident. Sin.*, 29(2): 332 – 337. [胡增辉, 杨迪, 沈应柏, 2009. 不同损伤形式诱导合作杨叶片中酚类物质含量的差异. 西北植物学报, 29(2): 332 – 337]

Keating ST, Hunter MD, and Schultz JC, 1990. Leaf phenolic inhibition of gypsy moth nuclear polyhedrosis virus – role of polyhedral inclusion body aggregation. *J. Chem. Ecol.*, 16(5): 1445 – 1457.

Keating ST, Yendol WG, Schultz JC, 1988. Relationship between susceptibility of gypsy moth larvae (Lepidoptera: Lymantriidae) to a baculovirus and host plant foliage constituents. *Environm. Entomol.*, 17(6): 952 – 958.

Ludlum CT, Felton GW, Duffey SS, 1991. Plant defenses: chlorogenic acid and polyphenol oxidase enhance toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* to *Heliothis zea*. *J. Chem. Ecol.*, 17(1): 217 – 237.

Sandre SL, Tammaru T, Hokkanen HMT, 2011. Pathogen resistance in the moth *Orgyia antiqua*: direct influence of host plant dominates

over the effects of individual condition. *Bull. Entomol. Res.*, 101: 107 – 114.

Schultz JC, Lechowicz MJ, 1986. Host plant, larval age, and feeding behavior influence midgut pH in the gypsy moth (*Lymantria dispar*). *Oecol.*, 71: 133 – 137.

Summers CB, Felton GW, 1994. Prooxidant effects of phenolic acids on the generalist herbivore *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): potential mode of action for phenolic compounds in plant anti-herbivore chemistry. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 24(9): 943 – 953.

Wang XL, Wang YT, Duan LQ, Li HP, Feng SJ, 2014. Effects of four plant phenolics on the growth and development and fecundity of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(7): 831 – 836. [王晓丽, 王予彤, 段立清, 李海平, 冯淑军, 2014. 四种植物酚类物质对舞毒蛾生长发育及繁殖的影响. 昆虫学报, 57(7): 831 – 836]

Yamamoto RT, 1969. Mass rearing of tobacco hornworm. II. Larval rearing and pupation. *J. Econ. Entomol.*, 62: 1427 – 1431.

Yue HF, 2013. Induced Defense Responses of Green Poplar (*Populus cathayana* Rehd.) by Exogenous Jasmonic Acid. MSc Thesis, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot. [越慧芳, 2013. 外源茉莉酸对青杨的诱导防御反应. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文]

Yue HF, Duan LQ, Li HP, Zhang LN, Wang XL, Zhang ZL, 2013. Changes in activities of protective enzymes in green poplar induced by exogenous jasmonic acid and the effects on larval development of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(3): 270 – 275. [越慧芳, 段立清, 李海平, 张丽娜, 王晓丽, 张志林, 2013. 外源茉莉酸诱导的青杨叶片保护性酶活性变化及其对舞毒蛾幼虫生长发育的影响. 昆虫学报, 56(3): 270 – 275]

(责任编辑: 赵利辉)